



TITLE:

# Novel physicochemical properties of polyubiquitin chains( Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

Morimoto, Daichi

---

CITATION:

Morimoto, Daichi. Novel physicochemical properties of polyubiquitin chains. 京都大学, 2015, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19004>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

京都大学	博士（工学）	氏名	森本 大智
論文題目	Novel physicochemical properties of polyubiquitin chains (ポリユビキチン鎖の新規物理化学的性質)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、翻訳後修飾機構ユビキチン化がユビキチン分子自身あるいは基質タンパク質に与える物理化学的影響の研究成果をまとめたものである。序論ならびに本章3章を含む8章から構成されている。</p> <p>第1章は序論であり、ユビキチン化ならびにユビキチンの細胞内凝集体形成について記述している。試験管内において、ユビキチンは物理的・化学的に極めて安定で、可溶性の高いタンパク質である。一方、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患では、ユビキチンは脳内タンパク質凝集体に含まれていることが知られている。第1章ではこのようなユビキチンの持つ試験管内と細胞内の相反する物理化学的性質を示し、続く3つの章の導入としている。</p> <p>第2章では、確立した長鎖ポリユビキチン鎖の大量試料調製方法について記述している。リジン48結合型ポリユビキチン鎖を酵素反応で大量に合成し、複数の塩化ナトリウム濃度勾配を組み合わせた陽イオン交換クロマトグラフィー精製を行なうことで、ポリユビキチン鎖を2重合体から8重合体まで重合度別に高純度に調製することに成功した。また、得られたリジン48結合型4重合体、6重合体、8重合体についてはタンパク質結晶化に成功しており、確立した手法が構造生物学的解析ならびに物理化学的解析に適用可能であることを示している。</p> <p>第3章では、ポリユビキチン鎖の鎖長（重合度）依存的凝集体形成について論じている。示差走査熱量測定により、ポリユビキチン鎖は鎖長が増加するに従い、その熱力学的安定性が低下することを明らかにした。この鎖長依存的不安定化は、3種類のポリユビキチン鎖（直鎖、リジン48結合型、リジン63結合型）すべてにおいて観察出来た。さらに、熱変性や微弱な力学的応力により、ポリユビキチン鎖はアミロイド様線維を形成することが分かった。これらの現象は、ユビキチン化タンパク質（ユビキチン化FKBP12ならびにユビキチン化カルモジュリン）においても同様に観察でき、基質タンパク質の結合の有無に関わらず、ポリユビキチン鎖は鎖長依存的に熱力学的不安定化し、アミロイド様線維を形成することが分かった。また、細胞内において緑色蛍光タンパク質を結合させたモノユビキチンならびにポリユビキチン鎖を発現させ、細胞内における凝集体形成の有無を解析したところ、試験管内と同様に鎖長依存的に凝集体形成することが観察できた。さらに、細胞内で形成されたポリユビキチン凝集体はp62やLC3と共局在することが分かった。ATG7欠損細胞を用いた実験により、ポリユビキチン凝集体は細胞内タンパク質分解機構オートファジーにより選択的に分解されることが分かった。以上の結果から、ポリユビキチン鎖は鎖長依存的に熱力学的不安定化し、熱変性や力学的応力により線維状凝集体を形成することが分かった。また、細胞内ではポリユビキチン凝集体がオートファジーにより選択的に分解されることが観察できた。これらの新規のポリユビキチン鎖の物理化学的性質ならびに生物学的性質は、神経変性疾患で確認されるユビキチン陽性タンパク質</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	森本 大智
<p>凝集体の形成機構を理解する上で重要な証拠となり得ると考えられる。</p> <p>第4章では、ユビキチン化が基質タンパク質に与える熱力学的・構造学的影響について記述している。トリプトファン蛍光測定により、二種類の基質タンパク質FKBP12とFABP4はユビキチン化に伴い、熱力学的不安定化を引き起こすことを明らかにした。さらに、長鎖ポリユビキチン化により、この熱力学的不安定化の程度が増加することも分かった。示差走査熱量解析では、ユビキチン化は基質タンパク質の熱可逆性を失わせることが分かった。核磁気共鳴法により、ユビキチン化による基質タンパク質の主鎖の化学シフト変化を調べると顕著な差異が観察出来ず、ユビキチン化は基質タンパク質の静的な構造には影響を及ぼさないことが分かった。しかし、縦緩和速度、横緩和速度、異種核オーバーハウザー効果により求めたスペクトル密度関数を解析すると、ユビキチン化により基質タンパク質におけるマイクロ秒からミリ秒における主鎖の構造揺らぎが引き起こることが分かった。これらの結果より、ユビキチン化は基質タンパク質の静的構造に大きな影響を及ぼさない一方で、マイクロ秒からミリ秒の範囲のダイナミクスを変化させ、熱力学的不安定化ならびに熱可逆性損失をもたらすと示唆される。これらの知見は細胞内タンパク質凝集体形成の理解の一助となるだけでなく、細胞内分解酵素複合体プロテアソームにおけるタンパク質分解の新規の機構解明につながると考えられる。</p> <p>第6章は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。本論文で得られた知見は、元来独立した生命現象であった「神経変性疾患における脳内異常タンパク質凝集体形成」と「ユビキチン化」を直接的に繋げる新しい概念になり得ると期待できる。</p>			

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、翻訳後修飾機構ユビキチン化がユビキチン分子自身あるいは基質タンパク質に与える物理化学的影響に関する研究成果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. ポリユビキチン鎖の鎖長別大量調製方法を確立した。リジン48結合型ポリユビキチン鎖を酵素反応で合成し、複数の塩化ナトリウム濃度勾配を組み合わせた陽イオン交換クロマトグラフィー精製を行なうことで、ポリユビキチン鎖を重合度別に高純度に調製することに成功した。また、調製したポリユビキチン鎖の結晶化にも成功しており、X線結晶構造解析への貢献が期待できる。
2. ポリユビキチン鎖の鎖長依存的凝集体形成を明らかにした。示差走査熱量測定によりポリユビキチン鎖は重合度が増加するに従い、その熱力学的安定性が低下することが明らかとなった。また、熱や力学的応力によりアミロイド様線維を形成することを示した。細胞内でも試験管内同様の鎖長依存的な凝集体形成が観察でき、さらにこの凝集体は細胞内タンパク質分解機構オートファジーにより選択的に分解されることを明らかにした。
3. ユビキチン化が基質タンパク質に与える熱力学的ならびに構造学的影響を明らかにした。二種類の基質タンパク質FKBP12とFABP4はユビキチン化に伴い、熱力学的不安定化を引き起こし、長鎖ポリユビキチン化によりその熱力学的不安定化が増加することが明らかとなった。加えて、核磁気共鳴法を用いた緩和解析では、ユビキチン化によって基質タンパク質主鎖の構造揺らぎが引き起こることも明らかにした。

以上、本論文はポリユビキチン鎖の鎖長に関する極めて新しい物理化学的ならびに生物学的性質を解明した。本論文の内容は国内外のユビキチン研究分野や神経病理学分野において画期的な成果であり、大いに学術的・実務的意義をもつ。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年2月25日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。